Farelerde uzun süreli-tekrarlı koku uygulamasının epizodik bellek ve uzaysal bellek üzerine etkileri ve bu süreçte serotonin 5-HT_4 reseptörlerinin olası katkısı

Nursu ERDOĞAN, Fulya GÖRGÜLÜ, Can KERESTECİOĞLU, Doğancan Özer, İrem SARAÇOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Ş. Remzi ERDEM

ÖZET:

Koku ile öğrenme ve bellek süreci arasında evrimsel ve bütünleşik bir ilişki vardır.

Epizodik belleğin, kokuyla ilişkili olan entorhinal korteks ile gyrus dentatus ve hipokampustaki CA3 bölgesi arasındaki nöronal ileti ağıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Alzheimer hastalığında ilk etkilenen beyin bölgelerinden olan temporal lob, epizodik bellek için çok önemli bir bölgedir. Son yıllarda, epizodik belleğin bozulmasıyla karakterize olan Alzheimer hastalığının gelişim süreci ile koku duyusu arasında bir ilişki olabileceğine dair bulgulara ulaşılmıştır. Bu da kokunun öğrenme ve bellek süreci ile ilişkili bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Öğrenme-bellek için kilit bölgelerden olan hipokampus serotonerjik reseptörlerden oldukça zengindir. Serotonin 5-HT4 reseptörleri hipokampus, frontal korteks ve limbik sistem bölgelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Bu çalışmada uzun süreli-tekrarlı koku uygulamasının epizodik bellek ve uzaysal bellek üzerine etkilerinin ve bu süreçte serotonin 5-HT4 reseptörlerinin olası katkısının C57BL/6 fareler üzerinde gösterilmesi amaçlandı.

Araştırmamızda 24 adet erişkin (26,2±0,52 g) erkek, C57/BL6 fareler kullanıldı. Farelerin uzaysal öğrenme-bellek işlevleri Barnes Labirenti (BL) düzeneği aracılığıyla değerlendirildi. BL, 5 ardışık gün boyunca ve her gün aynı saatlerde uygulandı. Bu sayede fareler, uzaysal öğrenme-bellek yönünden homojen ve eşit olarak 4 gruba ayrıldı. Gruplar, 1. grup: kontrol grubu (K), 2. grup: çeşitli kokulara (12 doğal koku, 14 gün) maruz bırakılan grup (O), 3. grup: kokuya maruz bırakılmaksızın 5HT4 ligandı (sisaprid; 0,5 mg/kg, i.p., 14 gün) uygulanan grup (KS), 4. grup: sisaprid uygulanan ve çeşitli kokulara maruz bırakılan grup (OS) şeklinde oluşturuldu. 14 günlük koku ve sisaprid uygulamasının ardından 21. gün fareler BL retansiyon ve epizodik bellek testine tabi tutuldu.

Deney hayvanlarının henüz gruplara ayrılmadığı ve dolayısıyla eşit koşullara sahip olduğu ilk 5 ardışık günü kapsayan bazal öğrenme eğrilerine göre, latansın zamana bağlı azalması ile öğrenmenin gerçekleştiği saptandı. (1. gün: 112,4±3,82 sn, 2. gün: 75,5±9,74 sn, 3. gün: 64,6±8,88 sn, 4. gün: 67,2±9,54 sn, 5. gün: 43,7±7,84 sn). Koku farelerde, epizodik belleğin özellikle zaman bileşeni üzerinde olumlu (promnestik) etki gösterirken, uzaysal bellek üzerinde belirgin etki

göstermedi. Serotonin 5-HT4 reseptörlerinin epizodik bellek üzerine iki yönlü etkisinin (kontrol grubunda olumlu, koku grubunda olumsuz etki) olduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: epizodik bellek, sisaprid, koku, C57BL/6, Alzheimer

GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Koku duyusu

Koku duyusu, duyular arasında en az anlaşılmış olanıdır. Koku duyusuna aracılık eden sisteme "Olfaktör Sistem" adı verilir (Greenstein, 2000). Koku, havada çözünmüş bulunan kimyasal maddelerin olfaktör mukozada bulunan özgül reseptörler aracılığıyla algılanmasıdır (Greenstein, 2000). Son araştırmalara göre, her koku için özgül bir reseptörün aracılık ettiği, değişik koku bileşimlerinin ise farklı reseptörlerin eş zamanlı aktivasyonu ile algılandığı düşünülmektedir. Bu da milyonlarca kokunun nasıl ayırt edilebildiğini açıklamaktadır (Buck ve Axel, 2004).

Olfaktör sistemin anatomofizyolojisi

Olfaktör bulbus önbeynin bir parçasıdır ve ona olfaktör traktus ile bağlıdır. Kokusal uyaranları beyne ileten lateral olfaktör traktus (LOT) limbik sisteme, olfaktör kortekse ve anterior olfaktör çekirdeğe kollateraller verir. Olfaktör korteksin bileşenleri anterior kortikal amygdaloid çekirdek, anterior olfaktör çekirdek, lateral entorhinal korteks, periamygdaloid çekirdek, piriform korteks ve olfaktör tüberküldür. Bu bileşenler arasında karşılıklı intrensek bağlantılar bulunur (Greenstein, 2000). Ayrıca, olfaktör korteks ile olfaktör bulbus, hipokampus ve hipotalamus arasında da ekstrensek bağlantılar vardır (Greenstein, 2000).

Koku neden özel bir duyudur?

Bazı canlılar hayatta kalmak ve üremek için güçlü bir koku duyusuna gereksinim duyarlar, bu tür hayvanlara *makrosmatik canlılar* denir (Greenstein, 2000). İnsanlar ise makrosmatik canlılara göre koku duyusunun daha az önemli olduğu *mikrosmatik* canlılardır. Oysa, insanlar da çok düşük derişimlerdeki kokuları algılayabilirler. Sağlıklı bir koku duyusuna sahip olmak insanlar için de çok önemlidir. Örneğin, tat duyusu ancak koku duyusu ile eşgüdüm halinde çalışırsa işlevseldir. Yani anosmik (koku alamayan) bir kişide tat duyusu da kaybolur (Greenstein, 2000). İnsanlar görece az sayıda tadı (tatlı, tuzlu, ekşi, acı) algılayabilirken, binlerce farklı kokuyu ayırt edebilirler (Greenstein, 2000).
Filogenetik olarak aşağı sınıf hayvanlarda beynin koku ile ilgili bölümleri, gelişmiş olan ilk beyin yapıları arasında yer alır ve beynin geri kalan kısmının büyük bölümü kokuyla ilgili olan bu başlangıç bölümünün çevresinde toplanır. Olfaktör korteks filogenetik olarak "paleokorteks" olarak tanımlanır ve altı hücre katmanından oluşan "neokorteks"ten farklı olarak, genellikle üç hücre katmanından oluşur (Greenstein, 2000). Bu da olfaktör sistemin evrimsel olarak en eski duyu sistemlerinden olduğunun somut bir göstergesidir.

Kokunun bir diğer özelliği de fazik bir duyu olması, yani aynı kokuya bir süre sonra adaptasyon gelişmesi nedeniyle, koku yolaklarındaki elektriksel aktivitenin azalmasıdır (Poellinger ve ark., 2001; Meiss, 2003; Costanza, 2007; Ishikawa ve ark., 2007; Suzuki ve Bekkers, 2010).
Koku duyusunu diğer duyulardan ayıran en önemli özelliklerden biri de olfaktör sistemin, reseptörlerden başlayarak doğrudan kortekse ulaşması, yani diğer duyu sistemlerinden farklı olarak talamusa uğramamasıdır (Greenstein, 2000).
Koku duyusunu özel kılan bir diğer önemli özellik de olfaktör sistemin tamamen nöral bir sistem olmasıdır; koku aslında modifiye nöronlar olan olfaktör reseptörler tarafından algılanır, çevrimlenir (transdüklenir) ve sırasıyla olfaktör bulbus, lateral olfaktör traktus aracılığıyla olfaktör kortekse iletilir (Greenstein, 2000).

Öğrenme-bellek süreci ile koku duyusu arasında bir ilişki var mıdır?

Karmaşık bir nöral süreç olan öğrenme, kabaca bilginin toplanması, saklanması ve kullanılması anlamına gelir (Deiana ve ark., 2011). Öğrenme, yaşanan deneyimlerin davranışta az ya da çok kalıcı değişiklik oluşturması olarak da tanımlanır (Deiana ve ark., 2011; Kimble ve ark., 1961). Bellek ise öğrenme ile oluşan davranış değişikliklerinin gerektiği zaman kullanılmak üzere anımsanmasıdır (Deiana ve ark., 2011). Bellek türleri, içeriğine göre deklaratif (eksplisit) ve prosedürel (implisit) olarak, süresine göre kısa- ve uzun-erimli olarak, doğasına göre arşivsel ve geçici (işleyen bellek) olarak sınıflandırılabilir (Deiana ve ark., 2011). Deklaratif (eksplisit) bellek deneyimlerin bilinçli olarak geri çağrılarak kullanıldığı ve sözel olarak ifade edilebildiği, hipokampus-aracılı bir süreçtir, prosedürel (implisit) bellek ise önceki deneyimlerin bilinç gerektirmeden kullanılabildiği, daha çok alışkanlık, beceri, basit koşullanma gibi durumları tanımlayan hipokampustan bağımsız bir süreçtir (Deiana ve ark., 2011).
Özellikle, öğrenme sürecinin oluşumunun sinaptik güç ve plastisitedeki, yani postsinaptik membran potansiyelindeki, uzun erimli değişimlerle modifiye edildiği düşünülmektedir. Bu alanda temel hücresel mekanizmalardan olan *Long Term Potentiation* (LTP) ′ın, postsinaptik nöronu presinaptik nörondan salıverilen nörotransmiterlere karşı duyarlılaştırarak iki nöron arasında ileri iletişimi gerçekleştirdiği ve özellikle uzun dönem bellekte rolü olduğu düşünülmektedir. Öğrenme ve bellek işlevleri beyinde tek bir merkez tarafından değil, pek çok farklı nöron topluluğunun ve nöronal ileti ağının ortak katkısıyla yürütülen oldukça karmaşık bir süreçtir. Burada, son yıllarda bellek süreciyle ilgili yeni bir yaklaşımdan söz etmek gerekir. Bu görüşe göre, sinaptik yeni yapılanma bellek sürecini açıklamak için yeterli bir model değildir, çünkü bellek bir nöral devre değildir (Deiana ve ark., 2011).
Koku ile öğrenme ve bellek süreci arasında evrimsel ve bütünleşik bir ilişki vardır. Uzaysal öğrenme ve belleğin merkezi olarak bilinen hipokampus, olfaktör korteksin bir bölümü olarak geliştiği öne sürülmektedir.

Hipokampus ile entorhinal korteks arasında yakın ilişkiyi sağlayan karşılıklı bağlantılar vardır (Greenstein, 2000).

Epizodik bellek (Olay Belleği) nedir?

Epizodik bellek, geçmiş bir olayın *ne*, *ne zaman* ve *nerede* gerçekleştiği bilgisine ek olarak, geçmiş olayın bilince geri çağrılması ve yeniden yaşanması (bilişsel *"autonoetic"* farkındalık ve öznel zaman algısı) durumunu da tanımlar (Tulving, 2002). Epizodik bellek, aynı zamanda özgül kişisel deneyimleri anımsama kapasitesi anlamını da taşır (Eichenbaum, 2003).

"Epizot" sözcüğü, bir roman, film ya da öyküde geçen olay anlamında kullanıldığından (Türkçe Sözlük, 2011), epizodik bellek için uygun Türkçe karşılık olarak "olay belleği" ifadesi önerilebilir.

Epizodik belleğin, koku ile ilişkili olan entorhinal korteks ile *gyrus dentatus* ve hipokampustaki CA3 bölgesi arasındaki nöronal ileti ağı ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Palmer ve Good, 2011). Alzheimer hastalığında ilk etkilenen beyin bölgelerinden olan temporal lob, epizodik bellek için çok önemli bir bölgedir (Palmer ve Good, 2011). Son yıllarda, epizodik belleğin bozulmasıyla karakterize olan Alzheimer hastalığının gelişim süreci ile koku duyusu arasında bir ilişki olabileceğine dair bulgulara ulaşılmıştır (Cassano ve ark., 2011; Hidalgo ve ark., 2011; Makowska ve ark., 2011). Bu da kokunun öğrenme ve bellek süreci ile ilişkili bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, hayatta kalmak için büyük ölçüde koku duyusuna ihtiyaç duyan farelerde olfaktör korteks, homonculusun büyük bölümünü oluşturur. Bu nedenle, fareleri çeşitli kokulara maruz bırakarak sinaptik ağın yeniden yapılandırılmasının geliştirilmesi ve hipokampusla bağlantısının arttırılarak epizodik bellek ve uzaysal bellek oluşumunun olumlu yönde etkilenmesi olasıdır.

Öğrenme-bellek süreci ve/veya koku duyusu ile serotonerjik sistem arasında bir ilişki var mıdır?

Öğrenme bellek sürecine katkıda bulunan birçok mekanizmanın arasında serotonerjik sistem de yer alır (Lamirault ve Simon, 2001). Öğrenme-bellek için kilit bölgelerden olan hipokampus serotonerjik reseptörlerden oldukça zengindir (Spencer ve ark., 2004). Özellikle, serotonin (5-HT) reseptörlerinin 5-HT_4 alt-tipi hipokampus ve frontal korteks ve limbik sistem bölgelerinde yoğun olarak bulunmaktadır (Spencer ve ark., 2004). Nitekim, bir 5-HT_4 reseptörü parsiyel agonistinin öğrenme-bellek sürecini olumlu (promnestik) etkilediği bildirilmiştir (Moser ve ark, 2002). Yine, bir başka 5-HT_4 reseptörü parsiyel agonistinin nesne ve yer tanıma ile ilgili belleği artırdığı saptanmıştır (Lamirault ve Simon, 2001). 5-HT_4 reseptörlerinin uzaysal öğrenme-bellek sürecinde rol oynadığı da gösterilmiştir (Fontana ve ark., 1997). Ayrıca, yaşlı sıçanlarda 5-HT_4 reseptör aktivasyonunun koku ile ilişkili referans belleği güçlendirdiği bildirilmiştir (Marchetti ve ark., 2011). Yine, bellek gelişiminde 5-HT_4 reseptörlerinin rolü olduğuna dair farmakolojik kanıtlar vardır ve bu süreçte özellikle olfaktör tüberkül, hipokampal CA1 bölgesi, pariyetal, piriform ve singulat kortekste 5-HT_4 reseptörlerinin ekspresyonunun

arttığı gösterilmiştir (Manuel-Apolinar ve ark., 2005). Farelerde yapılan bir pasif sakınma deneyinde bir 5-HT_4 reseptör agonisti olan metoklopramidin antiamnestik etki gösterdiği saptanmıştır (Galeotti ve ark., 1997).

Rasyonel:

Kokunun sinaptik yeniden yapılanmayı geliştirmesi ve önbeyin ve hipokampusla olfaktör sistem arasındaki bağlantıların öğrenme bellek sürecini etkilemesi olasıdır. Ayrıca, bu bölgelerde yoğun olarak bulunan ve bellek gelişimi ile ilişkisi olduğu bilinen 5-HT_4 reseptörlerinin söz konusu süreci etkilemeleri beklenir. Çok sayıda kokusal uyaranın tekrarlı olarak verilmesiyle koku yolaklarının sürekli etkin durumda tutulmasını sağlamak olasılıkla LTP benzeri bir etki yaratarak öğrenme ve belleği geliştirecektir.

Amaç:

Uzun süreli-tekrarlı koku uygulamasının epizodik bellek ve uzaysal bellek üzerine etkilerini ve bu süreçte serotonin 5-HT_4 reseptörlerinin olası katkısını C57BL/6 fareler üzerinde göstermek

Varsayımlar:

Farelerde uzun süreli-tekrarlı koku uygulamasının, 1. epizodik bellek üzerinde olumlu (*promnestik*) etkisi vardır, 2. uzaysal bellek üzerinde olumlu etkisi vardır, 3. serotonin 5-HT_4 reseptörlerinin bu süreçte katkısı vardır.

YÖNTEM VE GEREÇLER:

Deney Hayvanları ve Barındırma koşulları:

Proje kapsamındaki deneysel çalışmalara Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulundan 10.04.2012 tarihinde onay alındıktan sonra başlandı (DA12/21). Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezinden sağlanan 24 adet erişkin (4-6 ay), erkek C57BL/6 ırkı fareler (26,2 ± 0,5 g) kullanıldı. Herhangi bir yiyecek ve su kısıtlamasının uygulanmadığı fareler, sıcaklık, bağıl nem ve 12 saatlik gece-gündüz döngüsü gibi değişkenlerin optimum düzeyde ve sabit tutulduğu bir barınakta onikişerli iki grup halinde, kafesler içinde barındırıldı. Deneyler gündüz saatlerinde gerçekleştirildi.

Protokol:

Öncelikle, farelerin uzaysal öğrenme-bellek işlevleri Barnes Labirenti (BL) düzeneği aracılığıyla değerlendirildi. BL, 5 ardışık gün boyunca ve her gün aynı saatlerde uygulandı. Bu sayede fareler, en azından uzaysal öğrenme-bellek yönünden homojen ve eşit olarak 4 gruba ayrıldı. Gruplar, 1. grup: kontrol grubu (**K**), 2. grup: çeşitli kokulara (12 doğal koku, 14 gün) maruz bırakılan grup (**O**), 3. grup: kokuya maruz bırakılmaksızın 5HT_4 reseptör agonisti (sisaprid; 0,5 mg/kg, *i.p.*, 14 gün) uygulanan grup (**KS**), 4.

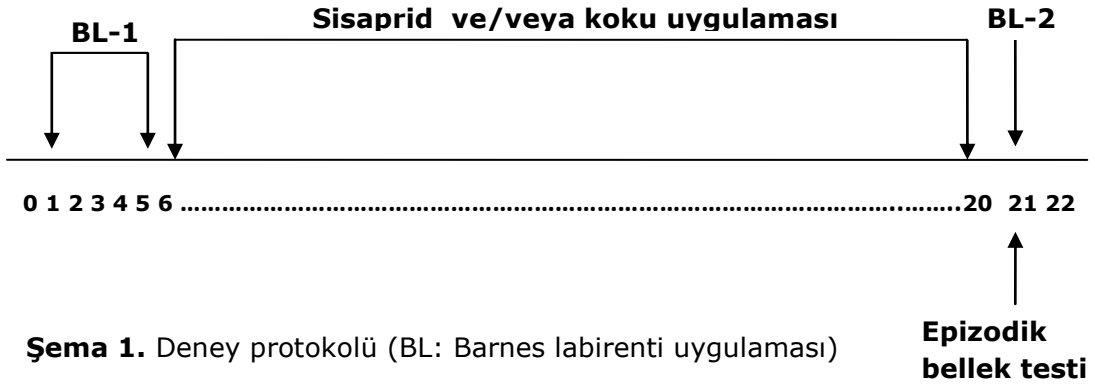
grup: sisaprid uygulanan ve çeşitli kokulara maruz bırakılan grup (**OS**) şeklinde oluşturuldu. (Tablo 1, Şema 1).

Tablo 1.Deney Grupları

		Sisaprid uygulaması	
		Yok	**Var**
Koku uygulaması	**Yok(n)**	Grup 1, **K** (*n=6*)	Grup 3, **KS** (*n=6*)
	Var(n)	Grup 2, **O** (*n=6*)	Grup 4, **OS** (*n=6*)

Koku Uygulaması:

O ve OS gruplarına 14 gün 12 çeşit doğal koku kaynağı (muz, çilek, portakal, limon, tarçın, karanfil, zencefil, zerdeçal, kahve, nane, kekik, kakao) kullanılarak uzun süreli, tekrarlayan koku uygulaması yapıldı. Her bir koku kaynağı 4 dakikada bir değiştirilerek, toplam 1 saat boyunca kokusal uyaran uygulandı, her koku kaynağı arasında 1′ boyunca ortam havalandırıldı. Koku kaynakları flakonlar içinde kafeslere yerleştirilerek uygulandı. K ve KS gruplarını da aynı işleme tabi tutmak açısından, koku kaynağı içeren flakonlar yerine içi boş flakonlar kullanıldı.



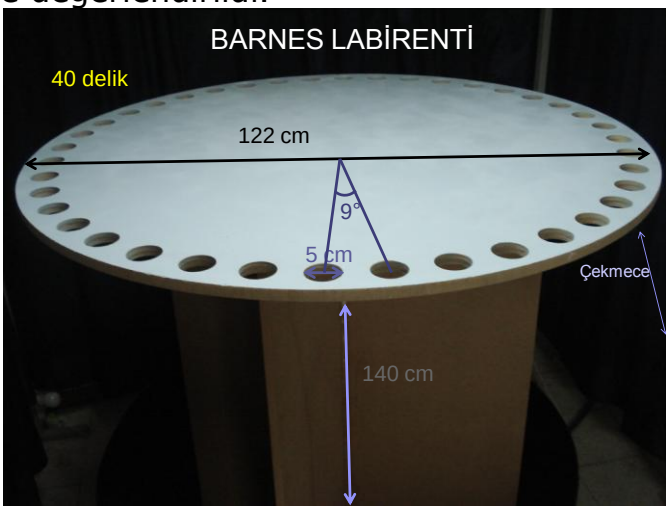
Şema 1. Deney protokolü (BL: Barnes labirenti uygulaması)

Barnes Labirenti:

BL, deney hayvanlarında uzaysal öğrenme ve bellek değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir.

Bu çalışmada kullanılan, fareler için tanımlanan boyutlara uygun olarak yapılan BL kullanıldı (Fotoğraf 1). BL, 122 cm çapındaki bir tahta plaka üzerine çapları 5 cm olan ve aralarında 9° açı bulunan 40 deliğin ve deliklerden birinin altında bir çekmecenin bulunduğu bir labirent düzeneği idi. Farelerin yer ve yön oryantasyonunu sağlamak için bir duvar boş olmak üzere diğer 3 duvara renk, şekil ve sayı bakımından birbirinden farklı nesneler konuldu (Fotoğraf 2). Duvarlardan birine 1 adet mavi daire, birine 2 adet kırmızı üçgen ve diğerine de 2'si beyaz eldiven 1'i beyaz kutu olmak üzere toplam 3 nesne asıldı. Fareler 5 ardışık gün boyunca, rasgele olmak üzere, etrafı kapalı bir silindir içinde düzeneğin tam ortasına bırakıldı. Her bir deney hayvanı için 120 saniye değerlendirme süresi tanındı. Deney hayvanının çekmeceyi bulması durumunda, her bir deney

hayvanı çekmece içinde 10 saniye bekletildi. Retansiyon bellek gelişimi 21. günde yine BL ile değerlendirildi.



Fotoğraf 1. Barnes labirentinin ölçüleri, boyutları ve çekmecenin konumu

Fotoğraf 2. Duvarlardaki renk, şekil ve sayı bakımından farklı nesnelerin görünümü

İlaç Uygulaması:

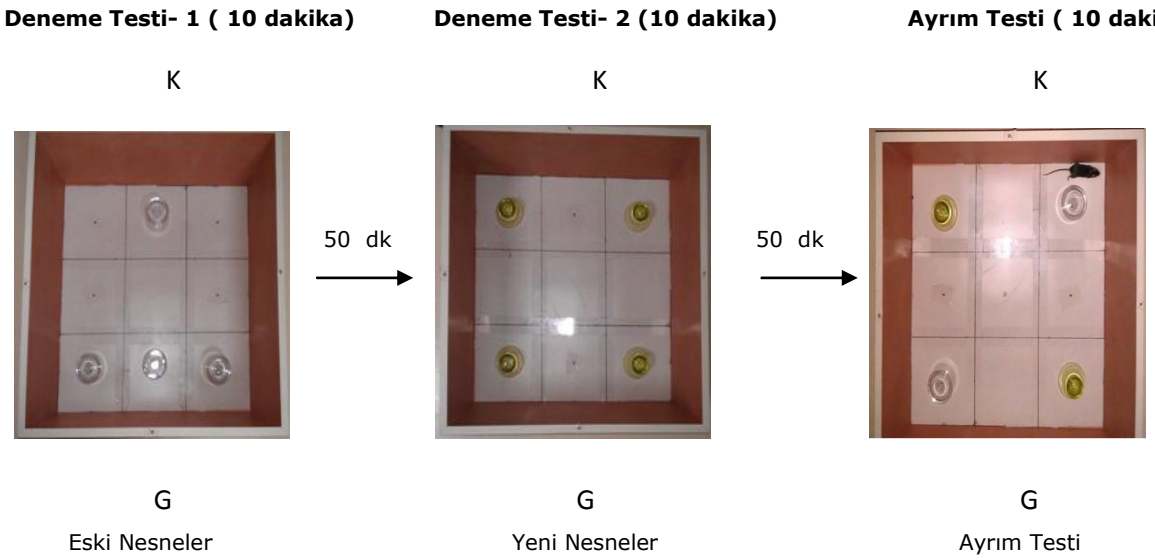
KS ve OS gruplarına vücut ağırlıklarına göre 14 gün boyunca 0,5 mg/kg, *i.p.* sisaprid uygulanırken, diğer gruplara da (K, O) enjeksiyon stresini ekarte edebilmek ve çözücünün olası etkisini yok edebilmek için sisaprid'in çözücüsü olan %1,25' lik aseton-dH2O çözeltisi uygulandı.

Epizodik bellek testi:

Epizodik bellek, geçerliliği daha önce gösterilmiş olan bir deney düzeneği ile değerlendirildi (Dere ve ark., 2005).

Farklı objeler için uzun dönem hafızası, uzaysal konumları ve bunların geri çağrılma sıraları 60x60x33 cm alanında ahşaptan yapılmış olan bir açık alanda belirlendi. Açık alanın zemini çizgilerle 9 eşit alana bölündü. Bilgisayara bağlı bir web-kamerası, labirentin 100 cm üzerine, örnek ve test deneylerini *offline* analiz etmek üzere yerleştirildi. Yükseklik, renk, şekil ve camdan yapılmış iki farklı tür nesne kullanıldı. Nesneler aynı maddeden yapıldığından dolayı test sırasında kokularında bir fark bulunmaması sağlandı. Fareler için bilinen etiyolojik bir önemi olmayan nesneler kullanıldı. Nesneler farelerin yerinden oynatamayacağı kadar ağırdı. Her deneyden sonra aparat ve nesneler, sırasıyla %75'lik etanol solüsyonu ve su ile temizlendi.

Her fare iki örnek (*eski nesneler, yeni nesneler*) deneyi ve bir test (*ayrım*) deneyine tabi tutuldu. İlk örnek deneyinde fareler üçgen şekilli uzaysal konfigürasyonda yerleştirilmiş birbirinin aynı 4 nesne içeren açık bir alana bırakıldı (Şema 2). Nesnelerden, biri kuzey duvarının ortasına, biri güney duvarının ortasına, biri güneybatı köşesine ve diğer bir nesne ise güneydoğu köşesine yerleştirildi. Farelerin 10 dakika boyunca bu nesneleri keşfetmelerine izin verildi. 50 dakikalık aradan sonra fareler ilkine benzer ikinci bir örnek deneyine sokuldu; burada, ilkinden farklı olarak, farklı türden 4 nesne farklı bir konfigürasyonda yerleştirildi (kuzeydoğu, kuzeybatı, güneydoğu ve güneybatı köşelerinde olmak üzere toplam 4 nesne). 50 dakikalık ikinci bir aradan sonra fareler test deneyine tabi tutuldu. Burada ise farklı olarak birinci örnek deneyinden iki kopya ("eski tanıdık" nesneler) ile ikinci örnek deneyinden iki kopya ("yeni tanıdık" nesneler) sunuldu. İkinci örnek deneyinden alınan iki nesnenin yerleri değişmezken, ilk örnek deneyinden alınan iki nesneden birinin yeri değiştirildi, diğerininki ise sabit tutuldu.



Şema 2. Epizodik Bellek Testi (K: Kuzey, G: Güney). İlk şemada kuzey, güneybatı, güney ve güneydoğu köşelerindeki "eski tanıdık" cisimler, ikinci şemada kuzeybatı, kuzeydoğu, güneybatı ve güneydoğu köşelerindeki "yeni tanıdık" cisimler ve üçüncü şemada güneybatı ve kuzeydoğu köşelerindeki "eski tanıdık" cisimler ile kuzeybatı ve güneydoğu köşelerindeki "yeni tanıdık" cisimler birlikte gösterilmiştir.

İstatistiksel analiz:

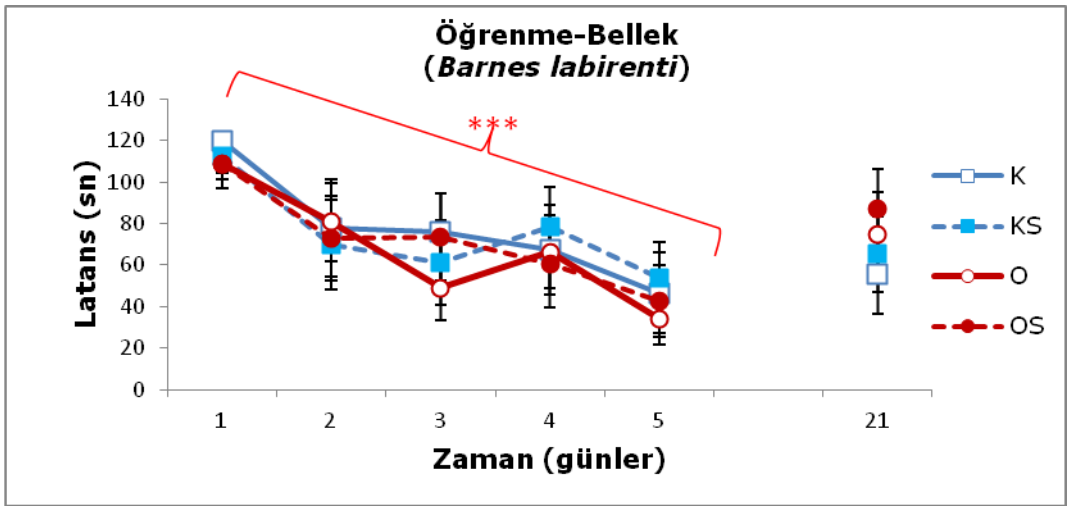
Tüm veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası (S.E.M.) olarak ifade edildi. İlk 5 günkü Barnes verileri tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi (ANOVA), 21. günkü Barnes retansiyon verileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Epizodik bellek verileri ANOVA ve eşlenmiş veriler için Student'ın *t* testi, post *hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırmalar testi ile değerlendirildi. Güven aralığı %5 olarak belirlendi. *P* değeri < 0,05 olan karşılaştırmalar istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

BULGULAR

Barnes Labirenti:

Deney hayvanlarının henüz gruplara ayrılmadığı ve dolayısıyla eşit koşullara sahip olduğu ilk 5 ardışık günü kapsayan bazal öğrenme eğrilerine göre, latansın zamana bağlı azalması ile öğrenmenin gerçekleştiği saptandı (1. gün: 112,4±3,82 sn, 2. gün: 75,5±9,74 sn, 3. gün: 64,6±8,88 sn, 4. gün: 67,2±9,54 sn, 5. gün: 43,7±7,84 sn).İlk 5 ardışık günü kapsayan bazal öğrenme eğrileri, istatistiksel olarak tek anlamlı çıkan veriydi.

Uygulamalar sonrasında bellek gelişimini değerlendirmek amacıyla 21. günde yapılan retansiyon incelendiğinde hem grupların kendi içinde hem de ilk 5 gün ve 21. günde yapılan retansiyon verileri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bu da uzaysal öğrenmenin gerçekleştiğini; ama uzun süreli belleğe aktarılmadığını gösterdi (Şekil 1).

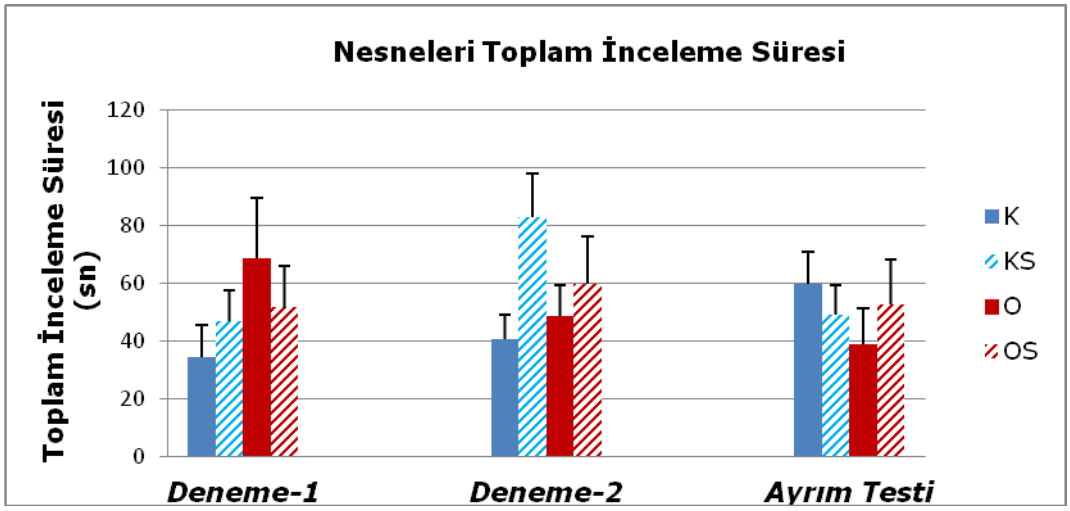


Şekil 1. Farelerde öğrenme-bellek sürecinin latans ölçütüne göre bazal (ilk 5 gün) ve retansiyon (21. gün) değerlendirmesi (K: Kontrol, KS: Kontrol+Sisaprid, O: Koku, OS: Koku+Sisaprid)**.**

Epizodik Bellek Testi:

Nesneleri Toplam İnceleme Süresi:

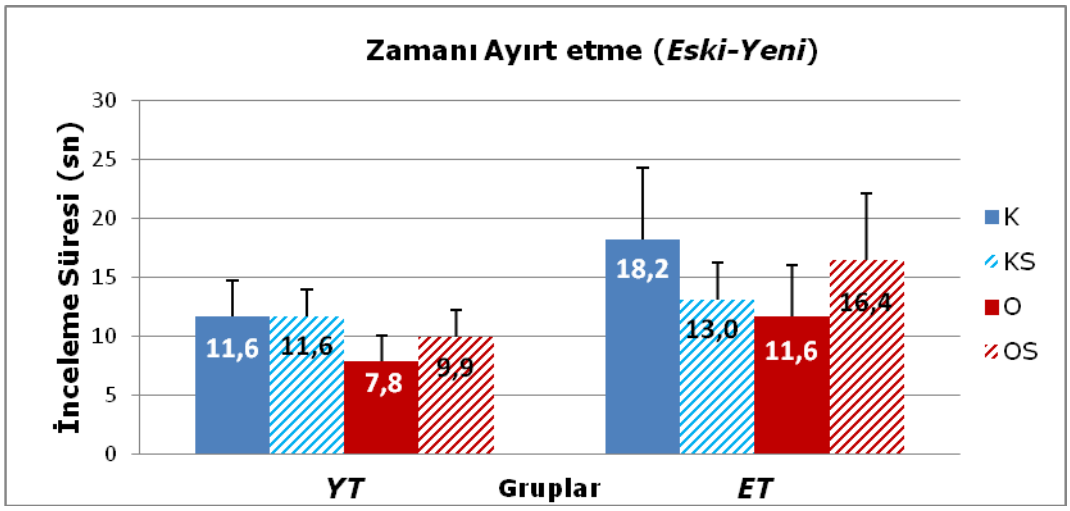
Ayrım testi incelendiğinde gruplar içinde nesneleri en az inceleyenin koku grubu (O) ve onu takiben kontrol+sisaprid grubu (KS) olduğu görülmesine rağmen, bu veri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 2).



Şekil 2. Eski tanıdık-Yeni tanıdık ayrımı yapılmadan nesneleri toplam inceleme süresi değerlendirmesi (K: Kontrol, KS: Kontrol+Sisaprid, O: Koku, OS: Koku+Sisaprid).

Zamanı Ayırt etme (Eski-Yeni):

Deneme testi-1'den eski tanıdık 2 nesne ve deneme testi-1'den yeni tanıdık 2 nesnenin incelenme süresi değerlendirildiğinde, tüm grupların (K, KS, O, OS) eski tanıdık nesnelerle daha fazla ilgilendiği görüldü. Eski tanıdık nesneler ve yeni tanıdık nesneler kendi içlerinde incelendiğinde yine nesnelerle en az ilgilenenin koku grubu (O) ve onu takiben kontrol+sisaprid (KS) olduğu görüldü. Ayrıca her iki grupta da (ET-YT) sisaprid'in kontrol grubunda nesnelerin incelenme süresini kısalttığı yani nesnelerin daha iyi hatırlanmasını sağladığı (olumlu etki), koku grubunda ise nesnelerin incelenme süresini uzattığı yani nesneleri hatırlama üzerine olumsuz etkisi olduğu görüldü; fakat bu bulguların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 3).

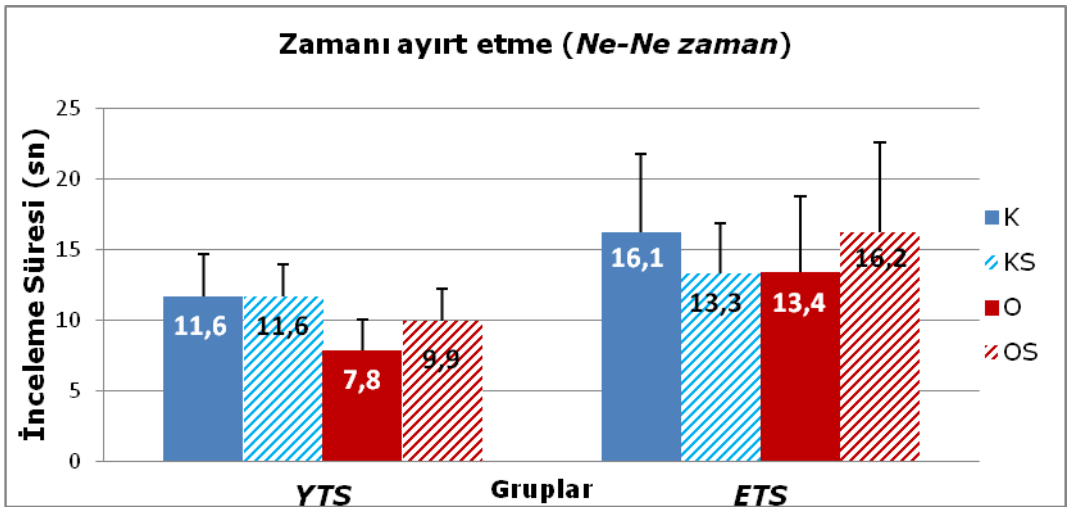


Şekil 3. Deneme testi-1' den eski tanıdık iki nesne ile Deneme testi-2'den yeni tanıdık 2 nesnenin incelenme süresi. Eski tanıdık yeri değişen nesne de eski tanıdık nesne içinde

değerlendirildi (YT: yeni tanıdık, ET: eski tanıdık, K: Kontrol, KS: Kontrol+Sisaprid, O: Koku, OS: Koku+Sisaprid).

Zamanı Ayırt Etme (Ne-Ne Zaman):

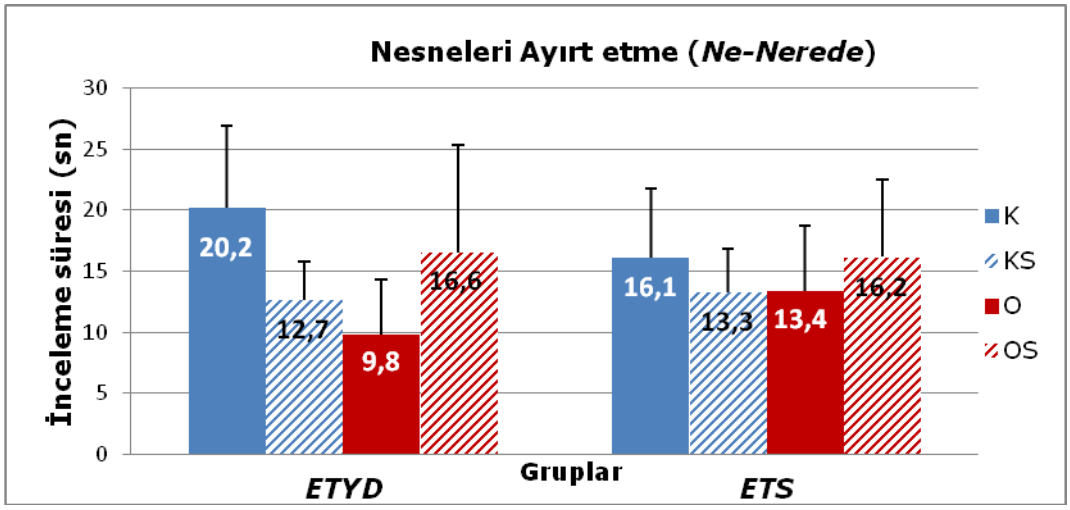
Deneme testi-1' den eski tanıdık yeri sabit olan 1 nesne (ETS), Deneme testi-2'den yeni tanıdık yeri sabit olan 2 nesnenin ortalaması alınarak (YTS) değerlendirildi. Burada Şekil 3'ten farklı olarak yeni tanıdık yeri değiştirilen nesne değerlendirilmeye alınmadı. Şekil 4 incelediğinde yine her iki grupta da (YTS-ETS) nesneleri en az inceleyenlerin koku grubu (O) ve kontrol+sisaprid grubu (KS) olduğu dikkati çekti. Fareler eski tanıdık nesnelerle yeni tanıdık nesnelere göre daha çok ilgilendi. ETS grubu incelendiğinde sisaprid' in kontrol grubuna olumlu (nesneleri inceleme süresini azaltan), koku grubuna olumsuz (nesneleri inceleme süresini arttıran) etkisi görüldü. Benzer durum YTS grubunda da görüldü. Ancak bu bulgular da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4).



Şekil 4. Deneme testi-1' den eski tanıdık yeri sabit 1 nesneyle Deneme testi-2'den ortalaması alınan yeni tanıdık yeri sabit 2 nesnenin incelenme süresi. Yeni tanıdık yeri değiştirilen nesne yeni tanıdık nesnelerin içinde değerlendirilmedi. (YTS: Yeni Tanıdık Sabit, ETS: Eski Tanıdık Sabit, K: Kontrol, KS: Kontrol+Sisaprid, O: Koku, OS: Koku+Sisaprid)

Nesneleri Ayırt Etme (Ne-Nerede):

Deneme Testi-1'den eski tanıdık yeri sabit olan nesne ile eski tanıdık yeri değişen nesnenin incelenme süresine bakıldığında, yine kontrol+sisaprid (KS) ve koku (O) grubu farelerinin nesnelerle en az ilgilendiği görüldü. Bu noktada bizi şaşırtan ise koku (K) ve kontrol+sisaprid (KS) gruplarının eski tanıdık yeri değişen nesneyi, eski tanıdık yeri sabit nesneden daha az incelemiş olmasıydı. Koku(K) ve kontrol+sisaprid (KS) grubunda eski tanıdık yeri sabit nesneyle neden daha çok ilgilendiği sorusuna mantıklı bir cevap bulunamadı. ETYD ve ETS gruplarının 2'sinde de sisaprid'in kontrol grubuna olumlu, koku grubuna olumsuz etkisinin olduğu izlendi; fakat bu bulguların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 5).



Şekil 5. Denem testi-1'deki eski tanıdık yeri değiştirilen ve yeri sabit olan nesnelerin incelenme süresi (ETYD: Eski Tanıdık Yeri Değişen, ETS: Eski Tanıdık Sabit, K: Kontrol, KS: Kontrol+Sisaprid, O: Koku, OS: Koku+Sisaprid).

TARTIŞMA

Bu çalışma, uzun süreli ve tekrarlı koku uygulamasının sinaptik yolları sürekli uyaracağı, sinaptik plastisite yaratabileceği, böylece öğrenme belleği geliştirebileceği ön görülerinden hareket edilerek tasarlandı. Beyinde uzaysal öğrenme-bellek için merkez kabul edilen hipokampus bölgesinin serotonerjik reseptörlerden yoğun olduğu ve 5-HT_4 reseptörlerinin uzaysal öğrenme-bellek sürecinde rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan deneyde uzaysal öğrenme ve kısa erimli bellek gelişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu halde, uzun erimli bellek gelişimi gözlenmedi. Beklentimizin aksine, uzun erimli bellek gelişiminin incelendiği retansiyon testinde kontrol (K), kontrol+sisaprid (KS), koku (O), koku+sisaprid (OS) grupları arasında arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Sisaprid alan gruplarda ilacın bir etkisi olarak gözlenen prokinetik etki bu gruplarda öğrenme üzerine anlamlı fark oluşmasını etkilemiş olabilir. Bununla birlikte fare sayısının azlığı da çalışmadan elde edilen bulguları olumsuz yönde etkilemiş olabilir. Sisapride bağlı olarak gözlenen etkiler ilacın çözücüsünden bağımsızdır..

Epizodik bellek testinde ise istatistiksel olarak anlamlı veriler bulunmamış olsa da bazı eğilimler saptanmıştır. Bu noktada şaşırtıcı olan nokta koku (K) ve kontrol+sisaprid (KS) gruplarının "ne-nerede" ayrım testindeki eski tanıdık yeri değişen nesnelerin, eski tanıdık yeri sabit nesnelerden daha az incelen eğiliminde olmasıydı. Çalışmanın diğer kısıtlılıkları ise 1 günde bitmesi planlanan epizodik bellek testinin 4 güne uzaması oldu. Farelerin epizodik bellek düzeneğine ön alıştırma süresinin kısa tutulmasının, cisimlerin incelenme süresini etkilediği düşünülmektedir, ileriki çalışmalarda ön alıştırma süresi daha uzun tutulursa bu faktör elimine edilebilir. Bunun yanında farelerin agresifliğinin ve 3 farenin beklenmeyen

ölümünün hem epizodik bellek hem uzaysal bellek testini olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

Önerimiz bu konuda yapılacak ileriki çalışmalarda fare sayısının artırılması, 5-HT_4 reseptör agonisti olarak daha seçici bir agonist kullanılması ve deney koşullarının optimize edilmesidir.

Sonuçlar ve Çıkarımlar

1.Koku farelerde,

- epizodik belleğin özellikle zaman bileşeni üzerinde olumlu (promnestik) etki gösterme eğilimindedir.
- Uzun erimli uzaysal bellek üzerinde belirgin etki göstermemektedir.

2.Serotonin 5-HT_4 reseptörlerinin epizodik bellek üzerine iki yönlü etkisi görülmüştür.

3.Epizodik bellek fare modeli bilişsel hastalıkların mekanizmasına ve tedavisine yönelik ipuçları sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Buck L., Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 23: 116 (2 Suppl): S117-9, 1p S119, 2004.
2. Tulving E. Elements of episodic memory : from mind to brain *Annual Review of Psychology*, *53,*1 -25, 2002.
3. Palmer A ve Good M. Hippocampal synaptic activity, pattern seperation and episodic-like memory: implications for Mouse models of Alzheimer's disease pathology. *Biochemical Society Transactions* 39(4): 902-909, 2011.
4. Makowska I, Kloszewska I, Grabowska A, Szatkowska I, Rymarczyk K. Olfactory deficits in normal aging and Alzheimer's disease in the Polish elderly population. *Arch Clin Neuropsychol*. 26(3): 270-9, 2011
5. Kimble GA, Hilgard ER, Marquis DG. Conditioning and Learning. New York: Appleton-Century-Crofts; 1961.
6. Spencer JP, Brown JT, Richardson JC, Medhurst AD, Sehmi SS, Calver AR, Randall AD. Modulation of hippocampal excitability by 5-HT4 receptor agonists persists in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 129(1): 49-54, 2004.
7. Moser PC, Bergis OE, Jegham S, Lochead A, Duconseille E, Terranova JP, Caille D, Berque-Bestel I, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Dumuis A, Bockaert J, George P, Soubrié P, Scatton B. SL65.0155, a novel 5-hydroxytryptamine(4) receptor partial agonist with potent cognition-enhancing properties. *J Pharmacol Exp Ther* 302(2):731-41, 2002.
8. Lamirault L, Simon H. Enhancement of place and object recognition memory in young adult and old rats by RS 67333, a partial agonist of 5-HT4 receptors. *Neuropharmacology* 41(7): 844-53, 2001.
9. Greenstein B. ve Greenstein A. The Special Senses, p. 250-253, Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology Thieme Stuttgart·New York 2000.
10. Meiss R.A., Sensory Physiology, Chapter 4, Part II Neurophysiology, Medical Physiology, 2nd edition, Ed. Rodney A. Rhoades, George A. Tanner, Lippincott Williams, 2003.
11. Costanzo L. S., Adaptation of Sensory Receptors, Chapter 3, Neurophysiology, Physiology, 3rd edition, Saunders Elsevier, 2007.
12. Suzuki N, Bekkers JM. Distinctive classes of GABAergic interneurons provide layer-specific phasic inhibition in the anterior piriform cortex. *Cereb Cortex* 20(12):2971-84, 2010.
13. Poellinger A, Thomas R, Lio P, Lee A, Makris N, Rosen BR, Kwong KK. Activation and habituation in olfaction--an fMRI study. *Neuroimage.* 13(4):547-60, 2001.
14. Ishikawa T, Sato T, Shimizu A, Tsutsui K, de Curtis M, Iijima T. Odor-driven activity in the olfactory cortex of an in vitro isolated guinea pig whole brain with olfactory epithelium. *J Neurophysiol* 97(1):670-9, 2007.

15. Fontana DJ, Daniels SE, Wong EH, Clark RD, Eglen RM. The effects of novel, selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)4 receptor ligands in rat spatial navigation. *Neuropharmacology* 36(4-5):689-96, 1997.
16. Marchetti E, Jacquet M, Escoffier G, Miglioratti M, Dumuis A, Bockaert J, Roman FS. Enhancement of reference memory in aged rats by specific activation of 5-HT(4) receptors using an olfactory associative discrimination task. *Brain Res* 1405:49-56, 2011.
17. Manuel-Apolinar L, Rocha L, Pascoe D, Castillo E, Castillo C, Meneses A. Modifications of 5-HT4 receptor expression in rat brain during memory consolidation. *Brain Res* 25;1042(1):73-81, 2005.
18. Türkçe Sözlük, s. 805, Türk Dil Kurumu Yayınları, Ankara, 2011.
19. Cassano T, Romano A, Macheda T, Colangeli R, Cimmino CS, Petrella A, LaFerla FM, Cuomo V, Gaetani S. Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease. *Behav Brain Res* 224(2):408-12, 2011.
20. Hidalgo J, Chopard G, Galmiche J, Jacquot L, Brand G. Just noticeable difference in olfaction: a discriminative tool between healthy elderly and patients with cognitive disorders associated with dementia. *Rhinology* 49(5):513-8, 2011.
21. Makowska I, Kloszewska I, Grabowska A, Szatkowska I, Rymarczyk K. Olfactory deficits in normal aging and Alzheimer's disease in the polish elderly population. *Arch Clin Neuropsycho*l 26(3):270-9, 2011.
22. Eichenbaum H. The hippocampus, episodic memory, declarative memory, spatial memory. . .where does it all come together? *International Congress Series* 1250 : 235– 244, 2003.
23. Deiana S, Platt B, Riedel G. The cholinergic system and spatial learning. *Behavioural Brain Research* 221: 389–411, 2011.
24. Galeotti N, Ghelardini C, Teodori E, Gualtieri F, Bartolini A. Antiamnesic activity of metoclopramide, cisapride and SR-17 in the mouse passive avoidance test. *Pharmacol Res* 36(1):59-67, 1997.
25. Yoshikawa T, Yoshida N, Oka M. The broad-spectrum anti-emetic activity of AS-8112, a novel dopamine D2, D3 and 5-HT3 receptors antagonist. *Br J Pharmacol*133(2):253-60, 2001.
26. Bhosale KB, Balsara JJ, Gaonkar RK, Bhosale BB, Gupta SK. Dose-dependent response of central dopaminergic systems to metoclopramide in mice. *Indian J Exp Biol* 35(6):618-22, 1997.
27. Nomura K, Maeda N, Yoshino T, Yamaguchi I. A mechanism of 5-HT3 receptor mediation is involved etiologically in the psychological stress lesion the stomach of the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 271(1):100-6, 1994.
28. Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. Integrated memoru for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 84: 214-221, 2005.